

REGENERACIÓN DE PLANTAS DE *Paulownia elongata* Steud. POR ORGANOGÉNESIS DIRECTA

REGENERATION OF *Paulownia elongata* Steud. PLANTS BY DIRECT ORGANOGENESIS

Carlos R. Castillo-Martínez¹, Ma. Alejandra Gutiérrez-Espinosa²,
Marco T. Buenrostro-Nava², Víctor Manuel Cetina Alcalá² y Jorge Cadena Iñiguez²

RESUMEN

Paulownia elongata es una especie forestal de origen oriental y rápido crecimiento, que fue introducida en México a finales de 1998 para ser incorporada en plantaciones comerciales maderables, pues su madera es ligera, por lo cual se emplea en la manufactura de muebles, artesanías, instrumentos musicales y en el acabado de interiores. El objetivo de este trabajo fue determinar las mejores condiciones de cultivo *in vitro*, para la regeneración de plántulas de *P. elongata* a partir de diversos tipos de explantes de segmentos internodales, foliares y peciolares, lo que derivó en un protocolo para organogénesis directa apto para usarse en sistemas de transformación genética. En todos los casos el medio Murashige y Skoog (MS) fue adicionado con 6-benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA), en distintas concentraciones. Se obtuvo respuesta en la totalidad de los explantes con la combinación de 5 mg L⁻¹ de BA y 1.0 mg L⁻¹ de ANA; sin embargo, los segmentos internodales mostraron una mejor inducción de brotes: 83% de explantes con brotes y 1.52 brotes por explante con la combinación de 4 mg L⁻¹ de BA y 0.2 mg L⁻¹ de ANA, a diferencia de los segmentos de pecíolo que produjeron sus mejores resultados de 53% de explantes con brote y 0.62 brotes por explante, con una mezcla de 7 mg L⁻¹ de BA y 0.2 mg L⁻¹ de ANA.

Palabras clave: 6-Benciladenina, ácido naftalenacético, explantes, micropropagación, *Paulownia elongata* Steud., plantaciones forestales.

ABSTRACT

Paulownia elongata is an oriental fast-growing forest species that was introduced in Mexico at the end of 1998, as an option for wood commercial plantations, since its timber is light, which favours its use in furniture manufacturing, handicrafts, music instruments and in interior finish. The aim of this work was to determine the best *in vitro* culture conditions for plant regeneration of *Paulownia elongata* through several types of explants from stem segments (internode), leaves and petiole, which resulted in a protocol for direct organogenesis that can be used in genetic transformation systems. In all cases, to the basal MS medium were added 6-benzyladenine (BA) from 5 mg L⁻¹ to 1.0 mg L⁻¹ and naphthalenacetic acid (NAA) at different concentrations. Response was obtained in all of the explants with the 5 mg L⁻¹ BA and 1.0 mg L⁻¹ NAA combination; however internodal segments showed a better bud induction, by producing 83% explants with shoots and 1.52 shoots per explant with the 4 mg L⁻¹ BA and 0.2 mg L⁻¹ NAA combination, in contrast to those of petiole segments that produced their best results as 53% explants with shoots and 0.62 shoots per explant, with a 7 mg L⁻¹ BA and 0.2 mg L⁻¹ NAA mix.

Key words: 6-Benzyladenine, naphthalenacetic acid, explants, micropropagation, *Paulownia elongate* Steud., forest plantations.

Fecha de recepción: 27 de abril de 2010

Fecha de aceptación: 9 de abril de 2012

¹ Centro Nacional de Recursos Genéticos. INIFAP. Correo-e: castillo.carlos@inifap.gob.mx

² Especialidad de Genética, Colegio de Postgraduados.

INTRODUCCIÓN

Paulownia elongata Steud. es una especie forestal de procedencia oriental (China, Laos y Vietnam) de rápido crecimiento que fue introducida en México a finales de 1998 como una alternativa para el establecimiento de plantaciones comerciales. Desde una perspectiva económica, el género *Paulownia*, de la familia Scrophulariaceae, es importante en su lugar de origen, de donde se extendió a Japón, Australia, Brasil y Estados Unidos de América. Su madera posee densidad baja que le proporciona ligereza, razón por la cual se emplea en la manufactura de muebles, artesanías, instrumentos musicales y en el acabado de interiores (Zhu *et al.*, 1986).

Todas las especies de *Paulownia* tienen un gran potencial para la reforestación y el mejoramiento de suelos pobres (Zhu *et al.*, 1986; Melhuish *et al.*, 1990); así como otras características relacionadas con su rápido crecimiento que son ideales para los programas de agroforestería (Wang y Shogren, 1992), incluido el uso de sus hojas como forraje (Zhu *et al.*, 1986). Existen algunas especies tolerantes a períodos de sequía y adaptables a diferentes tipos de suelos, lo que favorece su cultivo en diversas condiciones y, que a su vez, incrementa su potencial económico (Tang *et al.*, 1980).

Paulownia spp. se reproduce a través de semillas y esquejes de tallo y raíz. En cuanto a la primera forma, uno de los principales problemas es que pueden presentar dormancia; además de que el crecimiento de las plántulas es menor que las derivadas de esquejes o multiplicadas *in vitro* (Bergmann y Moon, 1997). Respecto a la segunda, los esquejes de tallo, en general, son más difíciles de obtener; no obstante, en los de raíz el daño físico causado a la epidermis y al cortex provoca el ataque de patógenos (Tang *et al.*, 1980). Lo anterior sugiere la necesidad de definir métodos de regeneración por cultivo de tejidos, a partir de material libre de organismos nocivos y de manera aséptica; al respecto, Bergmann y Moon (1997) consignan la regeneración a escala con material proveniente de brotes adventicios de segmentos apicales de *P. elongata*.

La propagación vegetativa es esencial para la reproducción clonal eficiente en taxa de *Paulownia* y, en algunos aspectos, aventaja a la sexual (semillas), ya que para este tipo de reproducción asexual se pueden utilizar diversos tipos de tejidos con objetivos distintos, como por ejemplo, los segmentos foliares e internodales usados como explantes para la embriogénesis somática indirecta. En *P. elongata* se ha documentado la obtención de un promedio de 50.7 embriones somáticos por cada 100 mg de callo embriogénico, mediante la combinación de los reguladores de crecimiento TDZ y cinetina, después de cuatro semanas de cultivo (Ipecki y Gozukirmizi, 2004). Por otra parte, Song *et al.* (1991) usaron segmentos de hoja y de pecíolo para desarrollar embriones somáticos de *P. catalpifolia* Steud. con más de

INTRODUCTION

Paulownia elongata Steud. is a fast growing forest species of Oriental provenance (China, Laos and Vietnam) that was introduced in Mexico at the end of 1998 as an option for wood commercial plantations. From an economic perspective, *Paulownia* genus, Scrophulariaceae family, is important in its place of origin, from which it was dispersed to Japan, Australia, Brazil and the United States of America. As its timber has a low density, it provides a light condition, which is the reason why it is used in furniture manufacturing, handicrafts, music instruments and in interior finish (Zhu *et al.*, 1986).

All *Paulownia* species have a great potential for reforestation and soil improvement (Zhu *et al.*, 1986; Melhuish *et al.*, 1990) as well as other characteristics related to its fast growth that are ideal for agroforestry programs (Wang and Shogren, 1992), including the use of leaves as forrage (Zhu *et al.*, 1986). There are some tolerant species to drought and adaptable to different types of soils, which favours their cultivation in these conditions, and, in addition, increases its economic potential (Tang *et al.*, 1980).

Paulownia spp. propagates by seeds and by stem and root cuttings. One of the main problems related to the first form is that they might have dormancy, in addition to a lower seedling growth compared to that from cuttings or cultured *in vitro* (Bergmann and Moon, 1997). About the second, stem cuttings, in general, are more difficult to get; however, in those from roots, the physical damage caused to the epidermic tissues and the cortex provoke pathogenic attack (Tang *et al.*, 1980). The latter suggests the need to define regeneration methods for tissue culture, starting from material free of noxious organisms and in an aseptic way; in this regard, Bergmann and Moon (1997) reported the regeneration at scale with material that came from adventitious buds of apical segments of *P. elongata*.

Vegetative propagation is essential for an efficient clonal reproduction in taxa of *Paulownia*, and, in some details, it overtakes sexual (seeds), since for this kind of asexual reproduction several types of tissues can be used for different purposes, as, for example, foliar and internode segments used as explants for indirect somatic embryogenesis. In *P. elongata* it has been documented an average of 50.7 somatic embryos for each 100 mg of embryogenic callus by the combination of TDZ growth regulators and kinetin, after four weeks of cultivation (Ipecki and Gozukirmizi, 2004). On the other hand, Song *et al.* (1991) used segments of leaf and petiole to develop embryos with more than 65% of explants that formed callus, after four weeks. In a similar way, petioles and leaf segments for the regeneration of adventitious buds in other timber species like sandalwood (*Santalum album* L.) (Rao and Bapat, 1992).

65% de explantes que formaron callo, después de cuatro semanas. De manera similar, se han empleado pecíolos y segmentos foliares para la regeneración de brotes adventicios en otras especies maderables como sándalo (*Santalum album* L.) (Rao y Bapat, 1992).

Los tejidos usados de manera frecuente como explantes para la multiplicación clonal son los ápices o yemas axilares, como se ha realizado en la propagación de *P. catalpifolia* (Song *et al.*, 1990), *P. tomentosa* (Thunb.) Steud. (Rout *et al.*, 2001) y *P. fortunei* (Seem.) Hemsl. (Sharma *et al.*, 2003).

El avance en la micropropagación de diversas especies del género *Paulownia* es amplio; sin embargo, es necesario un protocolo de propagación *in vitro* enfocado en la organogénesis directa a partir de una gran cantidad de explantes capaces de constituir individuos procedentes de células o tejidos, para sistemas de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* Smith & Townsend, 1907 o por aceleración de partículas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material inicial fue recolectado de árboles de dos años de edad con una altura promedio de 5.5 m, en la localidad de El Aguaje, municipio Aguililla, estado de Michoacán, ubicada a 18° 44" latitud norte y 102° 47" longitud oeste.

Se disectaron brotes adventicios no mayores de 5 cm, a partir del segundo tercio de la base de los árboles, los cuales se colocaron en bolsas de polipapel para su transporte en una hielera hermética Coleman® (45 x 60 x 20 cm) al Laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética del Programa de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados. De manera inmediata a su llegada, se lavaron con jabón líquido Dial® y se enjuagaron con agua corriente para eliminar el polvo y otros elementos contaminantes. Las hojas se retiraron y los brotes fueron divididos en yemas axilares y apicales. En ambos casos, se dio un tratamiento de inmersión por 30 segundos en una solución de alcohol al 70% v/v y posteriormente en una de hipoclorito de sodio (Cloralex®) al 0.4 % v/v, durante 10 minutos. Por último, se aplicaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada en campana de flujo laminar.

Una vez desinfectado, el material se cortó con bisturí. Todas las yemas se transfirieron a cajas Petri con papel absorbente estéril, para eliminar el exceso de humedad, y se introdujeron a un medio Murashige y Skoog (MS) (1962) sin reguladores de crecimiento para su adaptación *in vitro*. Después de 30 días se generaron brotes mayores de 4 cm que fueron empleados para la separación de los explantes iniciales (hojas, tallos y pecíolos). Los segmentos foliares, que median en promedio 1 cm² y los

Tissues frequently used as explants for the clonal multiplication are the apex and axillary buds, as it has been done for the propagation of *P. catalpifolia* (Song *et al.*, 1990), *P. tomentosa* (Thunb.) Steud. (Rout *et al.*, 2001) and *P. fortunei* (Seem.) Hemsl. (Sharma *et al.*, 2003).

The accomplished advance in micropropagation of several *Paulownia* species is wide; however, it is necessary to count with a protocol of *in vitro* propagation focused on direct organogenesis from a great amount of explants that are able to form individuals that come from cells or tissues, for genetic transformation systems pondered by *Agrobacterium tumefaciens* Smith & Townsend, 1907 or by particles acceleration.

MATERIALS AND METHODS

Vegetal material

The original material was collected from two-year old trees with an average height of 5.5 m in El Aguaje town, Aguililla municipality, Michoacán State, located at 18° 44" North and 102° 47" West.

Adventitious buds not over 5 cm were dissected from the second third from the base of the trees, which were put into polypaper bags for their transportation in a 45 X 60 X 20 cm Coleman™ cooler and taken to the Biotechnology and Genetic Engineering Laboratory of the Genetic Resources and Productivity Program of Colegio de Postgraduados. Immediately after their arrival, they were washed with Dial™ liquid soap and were rinsed with running water to eliminate dust and other pollutants. Leaves were removed and buds were divided in axillary and apical buds. In both cases, an immersion treatment was applied during 30 minutes into an alcohol solution (70% v/v), and afterwards, another one into sodium hypochloride (Cloralex™ at 0.4 % v/v) for 10 minutes. Finally, three rinses were applied with distilled water in a laminar flow cabinet.

Once disinfected, the material was dissected by a scalpel. All the buds were transferred to Petri boxes with sterile absorbent paper in order to eliminate excessive moisture, and were put into a Murashige and Skoog (MS) (1962) medium, without growth regulators for their *in vitro* adaptation and after 30 days, buds larger than 4 cm were produced, which were used for initial explant separation (leaves, stems and petioles). Foliar segments, which measured 1 cm² in average and internode and of petiole, which were 1 cm long, were placed into different treatments.

internodales y de pecíolo de 1 cm de largo, fueron colocados en diferentes tratamientos.

Medio y condiciones de cultivo

Los medios y tratamientos establecidos, un total de 13, incluyeron las siguientes combinaciones de reguladores de crecimiento: ácido naftalenacético (ANA) (0.2, 0.5 y 1 mg L⁻¹) y 6-benciladenina (BA) (4, 5, 7 y 10 mg L⁻¹), más el testigo: medio MS sin reguladores. Todos se elaboraron con las sales inorgánicas y vitaminas del medio propuesto por MS, adicionado con 3% (p/v) de sacarosa y 7% (p/v) de agar (Merck®) y el pH se ajustó a 5.8. Se agregaron 25 mL de este medio en cajas de Petri de 100 x 15 mm y se sellaron con parafilm.

En cada caja de Petri se colocaron 20 explantes: los segmentos foliares fueron de 1 cm², y los internodales y de pecíolo tuvieron una longitud aproximada de 0.5 cm. Las condiciones de cultivo en el cuarto de incubación de 2.50 x 3.10 m con temperatura e iluminación controlada fueron las siguientes: temperatura de 28 °C ± 2 e intensidad lumínica de 70 µmol m⁻² s⁻¹ generada mediante lámparas fluorescentes y con fotoperiodo de 16/8 horas luz y oscuridad.

Enraizamiento y adaptación de plántulas

Para obtener plantas completas se enraizaron los brotes que presentaron una longitud promedio de 3 a 4 cm y se depositaron en frascos Gerber® transparentes (7.7 X 3.5 cm), cuyo contenido era un medio MS suplementado con 0.4 mg L⁻¹ de ácido indol butírico (AIB). En cada uno de ellos se dispusieron cuatro brotes, los cuales permanecieron durante cuatro semanas hasta formar las raíces e incrementar su longitud a 8 cm. Las plantas se aclimataron dentro del invernadero en macetas de 1 L, con una mezcla de agrolita, turba y vermiculita, en una proporción de 1:2:1 al 70% de sombra durante tres semanas.

Variables evaluadas

Las variables consideradas fueron el número de explantes con respuesta positiva para la formación de brotes y los brotes por explante generados durante cuatro semanas de incubación. Se determinó la acumulación de materia seca por tratamiento a partir del peso de las muestras obtenido en una balanza analítica de 110 a 310 g Ohaus Discovery®, después de 48 horas de secado a 72 °C. La evaluación del área foliar se realizó mediante el escaneo del total de hojas formadas junto con un objeto de referencia de 1 cm², para ser analizadas con el programa UTHSCSA (2002).

Medium and culture conditions

The 13 media and treatments included the following combinations of growth regulators: naftalenacetic acid (NAA) (0.2, 0.5 and 1 mg L⁻¹) and 6-benciladenine (BA) (4, 5, 7 and 10 mg L⁻¹), plus control, that was the MS medium without regulators. All of them were prepared with the inorganic salts and vitamins of the medium suggested by MS, to which 3% (p/v) of saccharose and 7% (p/v) agar (Merck™) were added, fixing pH to 5.8 in every case. 25 mL of this medium were placed into 100 x 15 mm Petri boxes, which were sealed with parafilm.

En each Petri box were placed 20 explants: foliar segments were 1 cm² and the internode and of petiole were around 0.5 cm long. Culture conditions in the 2.50 x 3.10 m incubation room with controlled temperature and light, were 28 °C ± 2 and 70 µmol m⁻² s⁻¹ produced by fluorescent lamps and a 16/ 8 light and darkness photoperiod.

Root production and seedling adaptation

In order to have complete plants, buds with an average length of 3 to 4 cm were put to root and were later transplanted to transparent Gerber™ (7.7 X 3.5 cm) bottles with MS medium, supplemented by 0.4 mg L⁻¹ indole butyric acid (IBA). Four buds were place in each of them, which remained there for four weeks until roots were formed and their length increased to 8 cm. Plants were acclimatized in the greenhouse in 1L pots, with a 1:2:1 agrolite- peat vermiculite mix, under 70% shadow for three weeks.

Assessed variables

Variables consisted on the response of bud formation, of explant number with a positive response for bud formation, as well as bud by explant formed during the four week incubation period. Dry matter accumulation by each treatment was measured by weighing samples in a 110 a 310 g Ohaus Discovery™ analytical balance after 48 h of drying at 72 °C. The assessment of the foliar area was made by scanning the total number of formed leaves, which were later transformed into a binnary system along with a 1 cm² reference object in order to analyze them with the UTHSCSA Image Tool (2000).

Statistical analysis

The experimental design was completely at random with one culture media and two different growth regulators with three (NAA) and four (BA) concentration degrees. When environmental conditions are present, the variation of responses came from that factor. The explant was the experimental unit, at a rate of 20 per each Petri box, with four of them per treatment. The Statistical Analysis System (SAS 9.2), 2009 was used to examine data by an analysis of variance, while mean comparison was calculated with the Duncan test.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue un factorial completamente al azar con un solo medio de cultivo y dos reguladores diferentes de crecimiento con tres (ANA) y cuatro (BA) niveles de concentración. Al existir condiciones ambientales controladas, la variación de las repuestas se originó por esto último. La unidad experimental fue el explante, a razón de 20 por caja de Petri, con cuatro de ellas por tratamiento. Los datos se examinaron a través del análisis de varianza, mientras que la comparación de medias fue con la prueba de Duncan utilizando el paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS 9.2), 2009.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de brotes

Se detectaron respuestas diferenciales en los tratamientos de tejidos según el tipo de explante y medio de cultivo, después de cuatro semanas; no obstante, se generaron brotes adventicios en todos los tejidos, a excepción del testigo, donde no se observó respuesta alguna organogénica (Cuadro 1). Resultados similares fueron descritos por Bergmann y Moon (1997) en la valoración de hojas y tallos.

Cuadro 1. Efecto de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en la formación de brotes de tres tipos de explantes de *Paulownia elongata*, después de cuatro semanas de cultivo.

Table 1. Effect of the different combinations of growth regulators in bud formation of three explant types of *Paulownia elongata* after four weeks of cultivation.

Medio	BA (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)	Explantes con brotes			Número de brotes por explante		
			Promedio			Promedio		
			Pecíolo	Hoja-Pecíolo	Entrenudo	Pecíolo	Hoja-Pecíolo	Entrenudo
MS1	0	0.0	-	-	-	-	-	-
MS2	4	0.2	-	-	0.83a	-	-	1.52a
MS3	4	0.5	-	-	0.47b	-	-	1.50a
MS4	4	1.0	-	-	0.31e	-	-	1.42a
MS5	5	0.2	-	-	0.40d	-	-	1.32bc
MS6	5	0.5	0.41b	-	0.48b	1.0c	-	1.03c
MS7	5	1.0	0.53a	0.50a	0.47b	1.06c	1.11b	1.12c
MS8	7	0.2	0.37c	0.36b	0.55b	1.66b	1.33a	1.39ab
MS9	7	0.5	-	-	0.46bc	-	-	1.29bc
MS10	7	1.0	-	-	0.18f	-	-	1.24bc
MS11	10	0.2	0.36c	-	0.83a	1.93a	-	1.06c
MS12	10	0.5	-	-	-	-	-	-
MS13	10	1.0	-	-	-	-	-	-

^a Valores promedio de cuatro repeticiones con 20 explantes por tratamiento. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($P = 0.05$), de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Duncan.

^a Average values of four replications of 20 explants per treatment. Values with the same letter are not significantly different ($P = 0.05$), according to Duncan's mean comparison test.

RESULTS AND DISCUSSION

Bud formation

Different responses in the tissue treatments were detected after four weeks, according to the kind of explant and culture medium; nevertheless, adventitious buds in all the tissues were formed, except for control, where no organogenic response was observed (Table 1). Similar results were described by Bergmann and Moon (1997) in the assessment of leaves and stems.

The greatest number of explants with a bud came from the intermodal segments (83%) in the MS2 medium, followed by those of petiole and leaf in MS7, with 53 and 50%, per cent values similar to those obtained in the MS11 medium; however, the benciladenine concentration was 10 mg L⁻¹, that is twice the content of MS7. In this regard, Ipecki and Gozukirmizi (2004) produced embryogenic callus from internode segments of *P. elongata*; thus, it is inferred that this kind of tissue might be used in the regeneration system by embryogenesis and direct organogenesis.

El mayor número de explantes con brote se originó de los segmentos internodales (83%) en el medio MS2, seguido por los de pecíolo y de hoja en el MS7, con 53 y 50%, porcentajes similares a los obtenidos en el medio MS11; sin embargo, la concentración de benciladenina fue de 10 mg L^{-1} , es decir, el doble de lo contenido en el MS7. Al respecto, Ipecki y Gozukirmizi (2004) generaron callo embriogénico a partir de segmentos internodales de *P. elongata*; de ahí que se infiera que este tipo de tejido tiene posibilidades para utilizarse en el sistema de regeneración por embriogénesis y organogénesis directa.

La formación de brotes por explante se alcanzó con el tratamiento MS2 en segmentos internodales, cuyo promedio fue el mayor (1.52); no obstante, cifras cercanas (1.24) se lograron en presencia de concentraciones altas de BA, como las del medio MS10. Los valores de pecíolos y hojas fueron menores y se generaron en el medio MS8, con 7 mg L^{-1} de BA y 0.2 mg L^{-1} de ANA. Así, para los primeros se formó 37% de explantes con brotes y 1.66 de brotes por explante, mientras que para los segundos, 36% y 1.33.

Los resultados señalan que, para la organogénesis directa, los segmentos internodales probaron ser el tejido ideal, cuando se busca esta ruta, y que el medio que produjo la mejor respuesta de promedio de explantes con brote, fue el mismo que originó el mayor número de brotes por explante, que en el caso de los internodales fue el tratamiento MS2 y para los de pecíolo y foliares, el MS7. Aun cuando todos los tipos de tejido evaluados lograron formar brotes, se observó una preeminencia de los segmentos internodales (Figura 1, A-G).

Este comportamiento también se ha observado en especies como neem (*Azadirachta indica* A. Juss), con la cual se ensayaron diferentes tipos de tejido y órganos procedentes de plántulas producidas por semilla (segmentos de cotiledón, hipocotilo, epicotilo, raíces y entrenudos) como explantes para iniciar su micropropagación. Al final se obtuvo una respuesta diferencial en cada órgano evaluado para la formación de los brotes (Neeta et al., 2001).

Al comparar los resultados de la organogénesis directa con los de la embriogénesis somática, en los que se utilizaron segmentos foliares e internodales como explantes iniciales, los primeros fueron los mejores en *Paulownia elongata* (Ipecki y Gozukirmizi, 2004); en cuanto a *P. fortunei* y *P. tomentosa*, Fan et al. (2001) presentaron una inducción de callo favorable en este tipo de tejidos.

Otra forma de producir plantas *in vitro* a gran escala es a través del uso de yemas apicales para la proliferación de yemas axilares en sistemas de micropropagación clonal, método que se ha comprobado en *P. fortunei* (Venkateswarlu et al., 2001) y *P. elongata* (Ipecki et al., 2001). Sin embargo, no se parte de una respuesta de organogénesis directa, lo que se

Bud formation by explant was accomplished in the MS2 treatment over internode segments, which had the highest average, 1.52; however, closer numbers (1.24) were obtained in high BA concentrations, such as those of MS10. The values from petioles and leaves were smaller and were produced in the MS8 medium, with 7 mg L^{-1} BA and 0.2 mg L^{-1} de NAA. For the first, 37% of explants with buds were produced and 1.66 buds per explant, while for the second, 36% and 1.33.

Results show that for direct organogenesis, internode segments proved to be the ideal tissue when this route is being explored and that the medium that had the best average explant with bud was the same that gave birth to the greatest number of buds per explant, that in the internode case, it was the MS2 treatment and for petiole and foliar, it was MS7. Even if all the types of tissue that were assessed were able to form buds, it was observed a superiority of internode segments (Figure 1, A-G).

This behavior has been observed in neem (*Azadirachta indica* A. Juss) too, with which different kinds of tissue and organs that came from seedlings produced by seeds (cotyledon segments, hypocotyle, epicotyle, roots and internodes) were tested as explants to start micropropagation. At the end, a differential response was obtained in each assessed organ for bud formation (Neeta et al., 2001).

When the results of direct organogenesis were compared to those of somatic embryogenesis, in which foliar and internodes segments were used as initial explants, it is observed that the first were the best in *Paulownia elongata* (Ipecki y Gozukirmizi, 2004); in regard to *P. fortunei* and *P. tomentosa*, Fan et al. (2001) got a favorable callus induction in this sort of tissues.

Another way to produce plants *in vitro* at a great scale is by using apical buds for the proliferation of axillary buds in clonal micropropagation systems, a method that has been probed for *P. fortunei* (Venkateswarlu et al., 2001) and *P. elongata* (Ipecki et al., 2001). However, it is not started with a direct organogenesis response, which is considered not right when it is meant to establish genetic transformation systems that demand bud formation from tissues used for that ending (Mohri et al., 2003).

Foliar area measurement and dry weight

The greatest foliar area was generated from petiole segments in the MS6 (Table 2), as when a small number of buds per explant was accomplished, competence for the mean diminished and buds grew more vigorously and without limitations inside the containers, which favored the development of the foliar system. Such a reaction is important for those interested in the photoautotrophic systems, where foliar area is a necessary element (Kozai and Kubota, 2001).

considera inadecuado cuando se pretende establecer sistemas de transformación genética que requieren la formación de brotes a partir de tejidos usados para ese fin (Mohri *et al.*, 2003).

The kind of container that is used may be involved in these responses, as indicated by experiences with different tropical micropropagated species, in which it is proved the possible interaction between the type of container and the development of seedlings: in those of small space, there is more intense

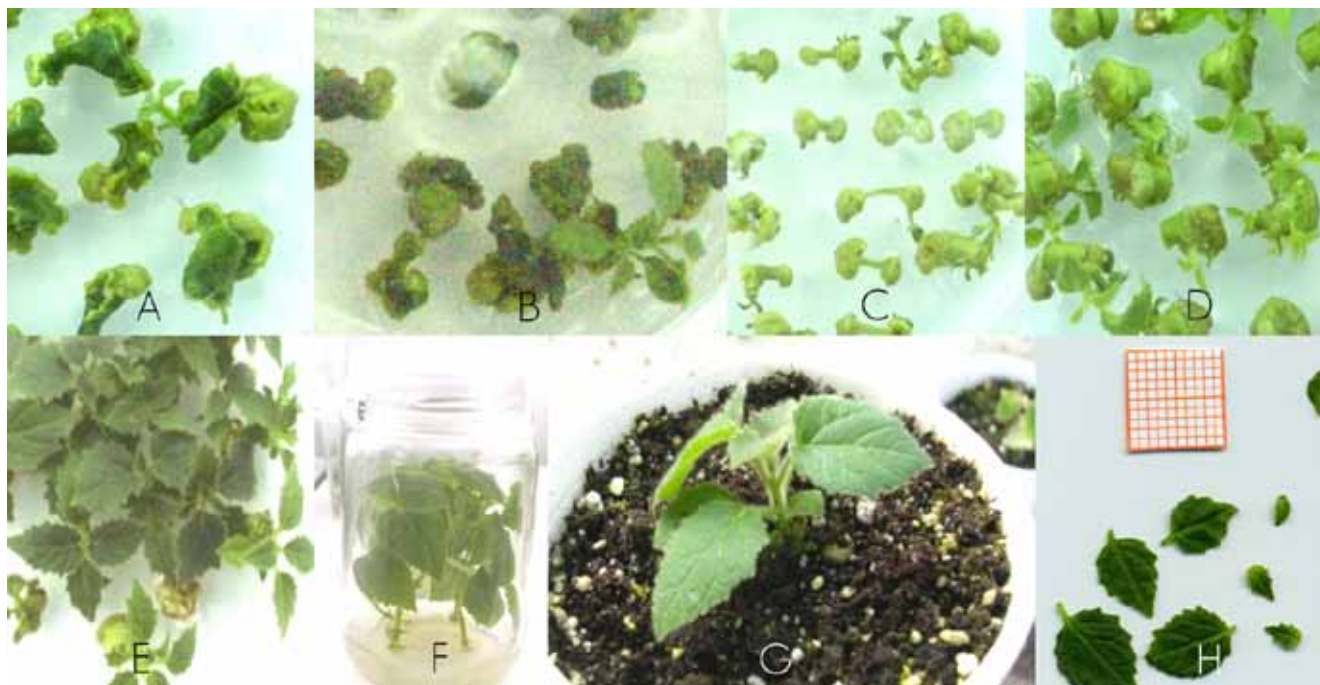


Figura 1. Regeneración de brotes de *Paulownia elongata* a partir de diferentes tipos de explantes. (A) = Segmentos foliares; (B) = Segmentos de hoja y pecíolo; (C) = Segmentos de pecíolo; (D) = Segmentos internodales de tallo; (E) = Brotes desarrollados; (F) = Brotes en medio de enraizamiento; (G) = Plantas adaptadas; (H) = Hojas disectadas y escaneadas para medición de área foliar por análisis de imágenes.

Figure 1. Bud regeneration of *Paulownia elongata* from different types of explants. (A) = Foliar segments; (B) = Leaf and petiole segments; (C) = Petiole segments; (D) = Internode stem segments; (E) = Developed buds; (F) = Buds in a rooting medium; (G) = Adapted plants; (H) = Dissected and scanned leaves for foliar area measurement by image analysis.

Medición del área foliar y peso seco

La mayor área foliar se generó a partir de segmentos de pecíolo en el medio MS6 (Cuadro 2), ya que al lograrse un bajo número de brotes por explante, la competencia por el medio disminuyó y los brotes crecieron de forma más vigorosa y sin limitaciones dentro de los recipientes, lo cual favoreció el desarrollo del sistema foliar. Dicha respuesta es importante para los interesados en los sistemas fotoautotróficos, donde el área foliar es un componente necesario (Kozai y Kubota, 2001).

El tipo de recipiente utilizado puede estar involucrado en estas respuestas, como lo indican estudios con otras especies forestales tropicales micropropagadas en lo que se demuestra la posible interacción entre el tipo de envase y el desarrollo de las plántulas: en aquellos de espacio reducido, se presenta mayor competencia por la luz y los nutrimentos del medio (Kozai y Nguyen, 2003).

competence for light and the nutriments of the medium (Kozai and Nguyen, 2003).

The treatments that showed a smaller number of buds per explant formed the most vigorous buds, and thus, a greater dry matter accumulation. This is observed in the buds of the MS8 medium for the internode segments, in the MS7 for the foliar and in the MS6 for those from petioles. This suggests that when the aim is to increase biomass, competence must be reduced; which favors a greater extraction of compounds from biomass increment obtained in these the influence of the kind of explant and the container, as well as the medium used for micropropagation, which has a direct effect on the generation of biomass and, consequently, on foliar area (Islam *et al.*, 2005).

Cuadro 2. Respuesta diferencial del área foliar medida por análisis de imágenes en cm² y de materia seca en diferentes explantes de *Paulownia elongata*.

Table 2. Differential response of the foliar area measured by image analysis in cm² and dry matter in different explants of *Paulownia elongata*.

Medio	Área (cm ²)			Materia seca (g)		
	Pecíolo	Hoja-Pecíolo	Entrenudo	Pecíolo	Hoja-Pecíolo	Entrenudo
MS1	-	-	-	-	-	-
MS2	-	-	2.08b	-	-	0.0075b
MS3	-	-	1.21d	-	-	0.0039c
MS4	-	-	0.43g	-	-	0.0014f
MS5	-	-	1.37cd	-	-	0.0035c
MS6	2.54a	-	1.13e	0.0060a	-	0.0024de
MS7	0.72c	2.08a	0.71f	0.0022bc	0.0038a	0.0019f
MS8	1.14b	0.94b	2.87a	0.0023bc	0.0029b	0.0109a
MS9	-	-	1.56c	-	-	0.0026d
MS10	-	-	1.19e	-	-	0.0029d
MS11	0.79c	-	0.65f	0.0026b	-	0.0022e
MS12	-	-	-	-	-	-
MS13	-	-	-	-	-	-

ª Valores promedio de cuatro repeticiones con 20 explantes por tratamiento. Valores acompañados de la misma letra no son significativamente diferentes con una P = 0.05 de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Duncan.

ª Average values of four replications of 20 explants per treatment. Values with the same letter are not significantly different (P = 0.05), according to Duncan's mean comparison test.

Los tratamientos que registraron un menor número de brotes por explante formaron los brotes más vigorosos y, por lo tanto, una mayor acumulación de materia seca. Esto se observa en los brotes del medio MS8 para segmentos internodales, en el MS7 para los foliares y en el MS6 para los de pecíolo. Lo anterior sugiere que cuando el objetivo es incrementar la biomasa, se debe reducir la competencia; con ello se favorece una mayor extracción de compuestos derivados del incremento en la biomasa obtenida en este tipo de sistemas (Shrutika *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2005).

Otros estudios también han demostrado la influencia de los tipos de explante y recipiente, así como del medio empleado para la micropropagación, lo cual tiene un efecto directo en la generación de biomasa y en consecuencia del área foliar (Islam *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

Se determinó un protocolo para la regeneración *in vitro* de *Paulownia elongata* vía organogénesis directa, a partir de segmentos internodales de tallo con una combinación de 4mg L⁻¹ BA y 0.2mg L⁻¹ ANA.

La combinación de BA y ANA en concentraciones altas permite generar brotes de tejidos como pecíolo y hojas, con menores tasas de multiplicación.

CONCLUSIONS

High BA and NAA concentrations make it possible to generate buds of tissues like petiole and leaves with lower multiplication rates.

The results here documented may be used as a starting point to obtain buds from small segments of tissues feasible to be used in genetic transformation processes.

A protocol was determined for *in vitro* regeneration of *Paulownia elongata* by direct organogenesis, from stem internode segments with a 4 mg L⁻¹ BA and 0.2 mg L⁻¹ NAA combination.

End of the English version

Los resultados que aquí se documentan pueden usarse como base para la obtención de brotes derivados de pequeños segmentos de tejidos susceptibles de utilizarse en los procesos de transformación genética. 

REFERENCIAS

- Bergmann, B. A. and H. K. Moon. 1997. *In vitro* adventitious shoot production in *Paulownia*. Plant Cell Rep. 16(5): 315-318.
- Fan, G., Z. Xiao Q., Z. Cui J. and B. Hui T. 2001. Callus induction from leaves of different *Paulownia* species and its plantlet regeneration. Journal of Forestry Research. 12 (4):209-214.
- Ipecki, Z., A. Atinkut, K. Kazan, K. Bajrovic and N. Gozukirmizi. 2001. High frequency plant regeneration from nodal explants of *Paulownia elongata*. Plant Biol. 3(2):113-115.
- Ipecki, Z. and N. Gozukirmizi. 2004. Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and internodal explants of *Paulownia elongata*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 79(3):341-345.
- Islam, M. T., D. P. Dembele and E. R. J. Keller. 2005. Influence of explant, temperature and different culture vessels on *in vitro* culture for germ plasm maintenance of four mint accessions. Plant Cell Tissue Organ Cult. 81 (2):123-130.
- Jain, A. K., P. K. Dubek and A. C. Rana. 2005. *In vitro* callus induction and biomass production of *Catharanthus roseus*. Plant Archives 5 (1):55-60.
- Kozai, T. and C. Kubota. 2001. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. Journal of Plant Research. 114 (1116): 525-537.
- Kozai, T. and Q. T. Nguyen. 2003. Photoautotrophic micropropagation of woody and tropical plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 271p.
- Melhuish, J. H., C. E. Gentry and P. R. Beckjord. 1990. *Paulownia tomentosa* seedling growth at different levels of pH, nitrogen and phosphorus. Journal of Environmental Horticulture. 8(4):205-207.
- Mohri, T., T. Igasaki and K. Shinohara. 2003. *Agrobacterium*-mediated transformation of paulownia (*Paulownia fortunei*). Plant Biotechnology. 20 (1):87-91.
- Murashige, I. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Phys. Plant 15:473-497.
- Neeta, D., H. Singh, S. Tivarekar and S. Eapen. 2001. Plant regeneration from different explants of neem. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 65(2):159-162.
- Rao, P. S. and V. A. Bapat. 1992. Micropropagation of Sandalwood (*Santalum album* L.). In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. pp. 193-210.
- Rout, G. R., G. M. Reddy and P. Das. 2001. Studies on *in vitro* clonal propagation of *Paulownia tomentosa* Steud and evaluation of genetic fidelity through RAPD marker. Silvae Genetica. 50:208-212.
- Sharma, S. K., S. Charan and R. C. Dhimman. 2003. Regeneration and multiplication of *Paulownia fortunei* (CO20 clone) through shoot tip culture. Indian Journal of Soil Conservation. 31:276-280.
- Shrutika, D., T. R. Ganapathi, S. Bhargava and V. A. Bapat. 2005. Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb and production of verbascoside in hairy roots. Plant Science 169 (5):812-818.
- Song, S. L., T. Sato, K. Ishii, A. Saito and K. Ohba. 1990. *In vitro* mass propagation by meristem culture of two mature trees of *Paulownia catalpifolia*. Journal of the Japanese Forestry Society. 72 (6):495-498.
- Song, S. L., K. Suda, K. Ishii, A. Saito and K. Ohba. 1991. Plantlet regeneration from leaf and petiole explants of *in vitro* cultured *Paulownia catalpifolia*. Journal of the Japanese Forestry Society. 73 (1):60-63.
- Statistical Analysis System (SAS). 2009. (Versión 9.2) Raleigh, NC USA s/p.
- Tang, R. C., S. P. Carpenter, R. F. Wittwer and P. H. Graves. 1980. *Paulownia*, a crop tree for wood products and reclamation of surface mind land. Journal of Applied Forestry 4:19-24.
- University of Texas Health Science Center at San Antonio Image Tool (UTHSCSA Image Tool). 2000. The University of Texas Health Science Center at San Antonio. San Antonio TX USA. s/p. (<http://compdent.uthscsa.edu/dig/>) (enero de 2010).
- Venkateswarlu, B., J. Mukhopadhyay, E. Sreenivasan and V. M. Kumar. 2001. Micropropagation of *Paulownia fortunei* through *in vitro* axillary shoot proliferation. Indian Journal of Experimental Biology. 39 (6):594-599.
- Wang, Q. and J. F. Shogren. 1992. Characteristics of the crop-*Paulownia* system in China. Agriculture, Ecosystems and Environment. 39:145-152.
- Zhu, Z. H., C. J. Chao, X. Y. Lu and D. Y. Xiong. 1986. *Paulownia* in China: cultivation and utilization. Asian Network of Biological Sciences. International Development Research Centre. Singapore. pp.1-65.